EINE NEUE SYNTHESE VON D-RIBULOSE

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Ina Greth

Saarbrücken

1973

AUS DER FACHRICHTUNG PHYSIOLOGISCHE CHEMIE
DES FACHBEREICHS 3 -THEORETISCHE MEDIZIN-
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

EINE NEUE SYNTHESE VON D-RIBULOSE

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung der Doktorwürde
der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

1973

vorgelegt von
INA GRETH
geb. am 19. 12. 1946 in Pirmasens

DEKAN: Professor Dr. med. H. KULENKAMPFF
REFERENT: Professor Dr. rer. nat. H. J. HAAS

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

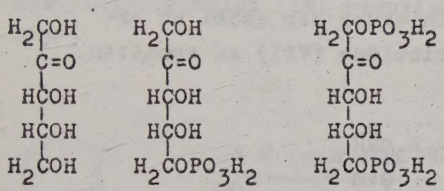
Die mündliche Promotionsprüfung wurde am 15.8.1973 abgelegt.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
1.	Einleitung	3
2.	Themenstellung	4
3.	Ergebnisse	4
4.	Diskussion	9
5.	Beschreibung der Versuche	10
6.	Zusammenfassung	11
7.	Literatur	12

1. EINLEITUNG

D-Ribulose (D-erythro-Pentulose, I) ist in der Natur bis jetzt nur in Form von Derivaten gefunden worden. D-Ribulose-5-phosphorsäure (II) ist Glied des Pentosephosphatzyklus und der Dunkelreaktion der Photosynthese, an der auch D-Ribulose-1,5-diphosphorsäure (III) beteiligt ist. 1-Desoxy-1-(o-carboxyphenylamino)-D-ribulose (IV) fungiert in Aerobacter aerogenes und Escherichia coli als Zwischenprodukt der Synthese von L-Tryptophan (DOY und GIBSON, 1959).



I II III IV

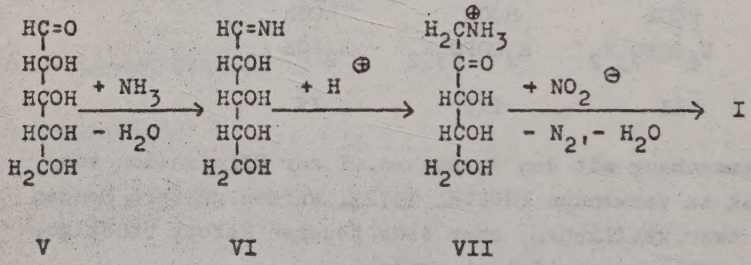
Im Zusammenhang mit den Versuchen, I zur Elimination von Ammoniak zu verwenden (GRETH, 1972), wurden größere Mengen dieser zwar käuflichen, aber sehr teueren Ketose benötigt. I mußte daher synthetisiert werden.

Bisher wurden 3 Wege zur Darstellung von I beschrieben. Entweder wurde I durch Isomerisierung von D-Arabinose oder D-Ribose (V, SCHMIDT und HEINTZ, 1934; GLATTHAAR und REICHSTEIN, 1935; MATSUSHIMA und IMANAGA, 1953) synthetisiert. I wurde auch durch alkalische Kondensation von Formaldehyd (MAYER und JÄSCHKE, 1960) oder durch Einwirkung von Agrobacterium tumefaciens auf D-Glucose (SUZUKI und HOCHSTER, 1965) gewonnen.

Wegen besserer Übersichtlichkeit werden die Zucker in offenkettiger Form und in der Schreibweise nach FISCHER geschrieben.

2. THEMENSTELLUNG

Die bisher bekannt gewordenen Methoden zur Darstellung von I sind verhältnismäßig umständlich, überdies liefern einige Synthesen nur unreine Präparate (vgl. Tabelle 1, Seite 9). Es sollte daher versucht werden, eine einfachere Synthese von reinem I auszuarbeiten. Hierfür bot sich an, zu versuchen, I durch säurekatalysierte AMADORI-Umlagerung (AMADORI, 1926, 1929, 1931; KUHN und DANSI, 1936; KUHN und WEYGAND, 1937) des leicht aus D-Ribose (V) gewinnbaren D-Ribosylamins (VI) und Desaminierung der dabei zu erwartenden 1-Desoxy-1-amino-D-ribulose (VII) zu erhalten.



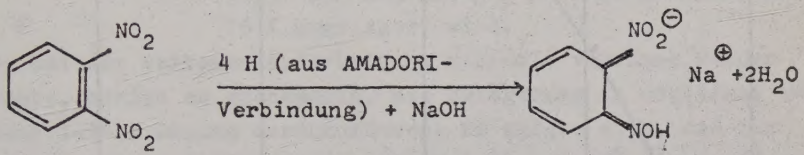
V VI VII

3. ERGEBNISSE

Um die Synthese möglichst einfach zu gestalten, wurde bewußt darauf verzichtet, VII zu isolieren. Da bis jetzt noch nie die AMADORI-Umlagerung eines Glycosylamins beschrieben wurde, mußten zunächst die Bedingungen für eine möglichst vollständige Umlagerung von VI ermittelt werden.

AMADORI-Umlagerungen von N-Glycosiden aliphatischer Amine laufen besonders gut in Gegenwart von Oxalsäure ab (HELFERICH und PORCK, 1953; MICHEEL und HAGEMANN, 1959). Daher wurde zunächst geprüft, ob Oxalsäure auch bei der Umlagerung von VI mit Erfolg einzusetzen ist.

In Gegenwart von Natronlauge wird o-Dinitrobenzol (VII) durch AMADORI-Verbindungen zu dem intensiv violetten und bei 555 nm photometrierbaren Natriumsalz des o-Nitrophenylhdroxylamins (IX) reduziert (KUHN und WEYGAND, 1936, 1937).

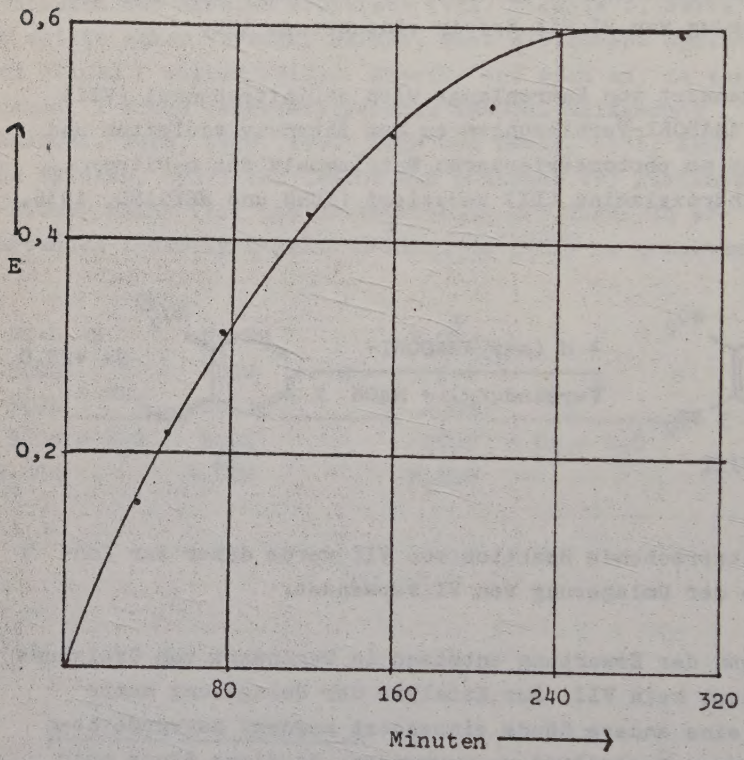


VIII IX

Die entsprechende Reaktion von VII wurde daher zur Kontrolle der Umlagerung von VI verwendet.

Entgegen der Erwartung entstand in Gegenwart von Oxalsäure überhaupt kein VII. Zur Katalyse der Umlagerung mußte daher eine andere Säure eingesetzt werden. Es wurde beschlossen, Essigsäure zu verwenden, da diese Säure auch bei vielen anderen AMADORI-Umlagerungen als Katalysator gedient hat (WEYGAND, 1940). In Gegenwart von Essigsäure kann VI tatsächlich zu VII umgelagert werden. Die Art, eine derartige Umlagerung durch Umsetzung des entstandenen VII mit alkalischem o-Dinitrobenzol zu verfolgen, geht aus Abbildung 1 hervor.

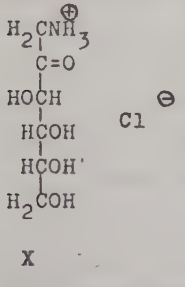
Abbildung 1. Zeitlicher Verlauf der AMADORI-Umlagerung von VI in Gegenwart von Essigsäure.



0,1 ml einer Lösung von 0,149 g (1 mMol) VI in 10 ml wasserfreiem Methanol und 1 ml Eisessig wurde bei den angegebenen Zeiten mit 6 ml einer bei 20° gesättigten Lösung von VIII in Methanol und 0,5 ml N NaOH vermischt. Nach 5 Min. wurde die Extinktion (E) bei 555 nm gemessen. Blindwert: 0,1 ml H_2O + 6 ml einer bei 20° gesättigten Lösung von VIII in Methanol + 0,5 ml N NaOH.

Man sieht, daß unter den in der Legende zu Abbildung 1 angegebenen Bedingungen 240-300 Minuten nach Beginn der Umlagerung kein weiteres VII entsteht.

Um das Ausmaß der Umlagerung zu ermitteln, wurde anschließend die durch definierte Mengen von 1-Desoxy-1-amino-D-fructose-hydrochlorid (X) zu erzielende Reduktion von VIII gemessen (Abbildung 2, Seite 8). Man sieht, daß die Reduktion der eingesetzten Menge an X direkt proportional ist. Unter der Voraussetzung, daß VIII durch VII ebenso stark reduziert wird, wie durch X, ergibt sich (durch Vergleich der Abbildungen 1 und 2), daß VI unter den angegebenen Bedingungen zu etwa 75 % umgelagert wird.

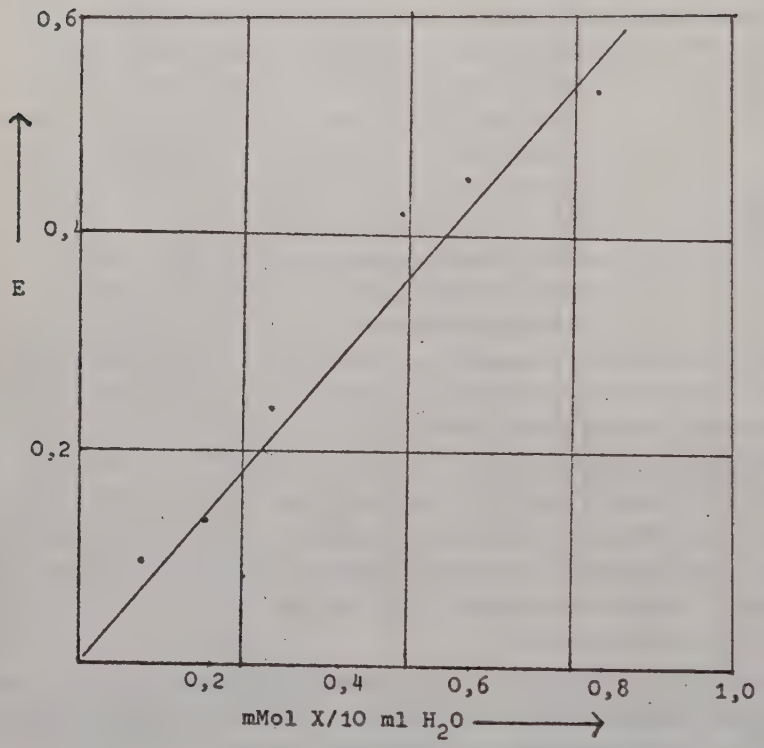


X

Da bei der weiteren Aufarbeitung mehrmals verdünnt werden mußte, schien es zweckmäßig, die Umlagerung in möglichst konzentrierter Lösung durchzuführen. Es zeigte sich, daß zur vollständigen Auflösung von 20 mMol VI bei 20° ein Gemisch aus 20 ml Eisessig und 15 ml wasserfreiem Methanol ausreicht. Um den Endpunkt der Umlagerung in diesen konzentrierten Ansätzen zu bestimmen, wurde die Änderung des Drehvermögens gemessen. Dadurch ergab sich, daß die Umlagerung bereits nach 60 Minuten beendet war.

Nach abgeschlossener Umlagerung wurde durch Zugabe von Wasser das nicht umgesetzte VI zu V und Ammoniak hydrolysiert. Die Abtrennung der Ribose gelang dadurch, daß man die Lösung auf eine Säule mit einem stark sauren Kationenaustauscher gab. Die Ribose wurde im Eluat durch die Reduktion von Fehlingscher Lösung nachgewiesen. Ribulosamin und Ammoniak wurden dann mit N HCl eluiert. Nach Entfernung der überschüssigen Salzsäure durch Rühren mit einem schwach basischen Anionenaustauscher engte man das Filtrat auf wenige ml ein. Dann wurde durch Zugabe einer äquimolaren Menge an Natriumnitrit desaminiert, wobei der pH-Wert durch Zutropfen eines geeigneten Acetatpuffers auf etwa 3,5 gehalten wurde.

Abbildung 2. Reduktion von VIII durch X.



Je 0,1 ml der angegebenen Lösungen von X wurden mit 6 ml einer bei 20° gesättigten Lösung von VIII in Methanol und 0,5 ml N NaOH vermischt. Nach 5 Min. wurde die Extinktion (E) bei 555 nm gemessen. Blindwert: 0,1 ml H_2O + 6 ml einer bei 20° gesättigten Lösung von VIII in Methanol + 0,5 ml N NaOH.

Nach Abtrennung der Ionen durch erneute Behandlung mit Ionenaustauschern erhielt man D-Ribulose mit einer Ausbeute von 30% d.Th. bezogen auf VI bzw. von 26% d.Th. bezogen auf V. Die Identität wurde durch chromatographischen Vergleich mit einem authentischen Präparat gesichert, wobei sich überdies zeigte, daß die gewonnene Substanz einheitlich war.

4. D I S K U S S I O N

Die Tabelle 1 gibt einen Überblick über die bisherigen Verfahren und den neuen Weg der Darstellung von D-Ribulose.

Tabelle 1. Verfahren zur Darstellung von D-Ribulose.

Autoren	Ausgangsmaterial	Ausbeute an D-Ribulose	Zeitbedarf
SCHMIDT u. HEINTZ (1934)	D-Arabinose	nicht angegeben	nicht angegeben
GLATTHAAR u. REICHSTEIN (1935)	D-Arabinose	26,5% (isoliert als o-Nitrophenylhydrazon	ca.4 Tage
MATSUSHIMA u. IMANAGA (1953)	D-Arabinose	3% (unreine Substanz) bzw. 12% (isoliert als o-Nitrophenylhydrazon)	4 Tage
MAYER u. JÄSCHKE (1960)	Formaldehyd	nicht angegeben (chromatographisch nachgewiesen)	6 Stdn.
SUZUKI u. HOCHSTER (1965)	D-Glucose	12% (nicht isoliert)	ca.1 Tag
vorliegende Dissertation	D-Ribose, bzw. D-Ribosylamin	26%, rein, bzw. 30%, rein,	10 Tage bzw. 2 Tage

Man erkennt, daß die neue Synthese die bisher beste Ausbeute an reiner D-Ribulose ergibt. Geht man, wie hier, von D-Ribose aus, ist allerdings der erforderliche Zeitaufwand größer als bei den älteren Verfahren.

5. BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

1. D-Ribosylamin (VI). - Die Substanz wurde in Anlehnung an die Vorschrift (CUSACK und SHAW, 1970) dargestellt: Die Suspension von 10 g D-Ribose in 50 ml einer gesättigten Lösung von Ammoniak in wasserfreiem Methanol (LUND und BJERRUM, 1927) wurde gerührt, bis alles in Lösung gegangen war. Dann ließ man etwa eine Woche bei 20° stehen. Das ausgefallene VI wurde abgesaugt, mit wenig Methanol-Äther (1:1) gewaschen und bei 20°/12 Torr über Calciumchlorid getrocknet. Ausbeute: 8,6 g (87%). Schmelzpunkt: 126-130°.

2. Versuch zur Umlagerung von VI in Gegenwart von Oxalsäure.- 0,149 g VI wurde in 10 ml wasserfreiem Methanol suspendiert und mit 90 mg wasserfreier Oxalsäure in Lösung gebracht. Proben von 0,1 ml wurden mit 6 ml einer gesättigten, gelblichen Lösung von o-Dinitrobenzol in Methanol mit 0,5 ml N NaOH vermischt. Auch nach längerer Reaktionsdauer blieb das Gemisch hellgelb.

3. D-Ribulose (VII). - 3 g VI wurden in einem Gemisch aus 15 ml wasserfreiem Methanol und 20 ml Eisessig unter Rühren gelöst. Nach 1 Std. bei 20° wurde die Lösung i.Vak. auf die Hälfte eingeengt und dann mit 2,5 ml Wasser versetzt. Nach 15 Stdn. bei 20° gab man die Lösung auf eine Säule (2x25 cm) mit Kationenaustauscher (Amberlite IR 120, H^+) und wusch mit Wasser, bis das Eluat nicht mehr mit Fehlingscher Lösung reagierte. Dann wurde mit N Salzsäure gewaschen, bis das Eluat Fehlingsche Lösung nicht mehr reduzierte. Das Eluat wurde durch Rühren mit 50 ml mit Wasser gequollenem Anionenaustauscher (Amberlite IR 45, OH^-) auf etwa pH 5 gebracht und i.Vak. auf etwa 3 ml eingeengt. Zu dem gelb-bräunlichen Konzentrat gab man unter ständigem Rühren 1,38 g Natriumnitrit in kleinen Portionen. Der pH-Wert (3,5) wurde durch Zutropfen eines Acetatpuffers (3,3 g Natriumacetattrihydrat + 41 ml Eisessig mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt) konstant gehalten.

Die Kontrolle erfolgte auf elektrometrischem Wege. Der entstehende Stickstoff (250 ml) wurde aufgefangen und volumetrisch gemessen. Sobald die Gasentwicklung beendet war, gab man die Lösung auf eine Säule (2x25 cm) mit Kationenaustauscher (Amberlite IR 120, H^+). Man wusch mit Wasser, bis das Eluat Fehlingsche Lösung nicht mehr reduzierte und brachte dann bei 20° i.Vak. zur Trockene. Es ergab sich 0,9 g VII (30% d.Th. bezogen auf D-Ribosylamin bzw. 26% d.Th. bezogen auf Ribose) in Form eines braunstichigen Sirups.

$[\alpha]_D^{22} = -5,7^\circ$ (c = 1, Wasser)

Das erhaltene Präparat erwies sich bei papierchromatographischer Prüfung (Papier Nr. 2043 Mgl der Firma SCHLEICHER und SCHÜLL, Dassel) in verschiedenen Laufmitteln (tert. Butanol/Methyläthylketon/Wasser/Ameisensäure 44:44:11:0,26; Isopropanol/Wasser/konz. Salzsäure 65:18,4:16) als einheitlich. Sprühmittel: Benzidin-Natriummetaperjodat (MERCK).

Die R_f-Werte (0,00 bzw. 0,65) stimmten mit denen eines authentischen Präparates (Firma FLUKA, AG, Buchs, Schweiz) überein. Das zuerst genannte Laufmittel eignet sich zur Unterscheidung von D-Ribose.

6. ZUSAMMENFASSUNG

D-Ribulose kann in einer zweistufigen Synthese auf dem Wege über Ribosylamin aus D-Ribose mit einer Ausbeute von 26% d.Th. synthetisiert werden. Das erhaltene Präparat ist chromatographisch einheitlich und identisch mit authentischer Ribulose. Diese Herstellung ist vorteilhafter als die bisher bekannten Synthesewege.

7. L I T E R A T U R

AMADORI, M. — Kondensationsprodukte aus Glucose und p-Phenetidin
Atti R.Acad. dei Lincei, Roma (6), 2, (1925): 337-342, zit. nach Chem. Zbl. 1926, I: 3036.

AMADORI, M. — Kondensationsprodukte aus Glucose und p-Phenetidin II
Atti R.Acad. dei Lincei, Roma (6), 9, (1929): 68-73, zit. nach Chem. Zbl. 1929, I: 2409.

AMADORI, M. — Kondensationsprodukte aus p-Anisidin und Glucose
Atti R.Acad. dei Lincei, Roma (6), 9, (1929): 226-230, zit. nach Chem. Zbl. 1929, II: 32.

AMADORI, M. — Kondensationsprodukte aus Glucose und p-Toluidin
Atti R.Acad. Lincei Roma (6) 13, (1931): 72, zit. nach Chem. Zbl. 1931, I: 3109.

AMADORI, M. — Kondensationsprodukte aus Glucose und o-Phenetidin, o-Anisidin und o-Toluidin
Atti R.Acad. Lincei Roma (6) 13, (1931): 195, zit. nach Chem. Zbl. 1931, II: 41.

CUSACK. N.J. und SHAW, G. — A simple synthesis in high yield of 2,3-O-isopropylidene-ß-D-ribo-furanosylamine, an intermediate in the preparation of N-substituted ribofuranosides
Chem. Commun. 17, (1970): 1114.

DOY, C.H. und GIBSON, F.	A compound formed by mutant strains of Aerobacter aerogenes and Escherichia coli blocked in the biosynthesis of Tryptophan Biochem. J. 72, (1959): 586-596.
GLATTHAAR, C. und REICHSTEIN, T.	D-Adonose (d-Erythro-2-keto-pentose) Helv.chim.Acta 18, (1935): 80-81.
GRETH, R.	Modellversuche zur Elimination von Ammoniak durch Ketosen Dissertation, Medizinische Fakultät der Univ. des Saarlandes, Homburg 1972.
HELFERICH, B. und PORCK, A.	Über Benzalverbindungen der Glucose Justus Liebigs Ann.Chem. 582, (1953): 233-235.
KUHN, R. und DANSI, A.	Über eine molekulare Umlagerung von N-Glycosiden Ber.dtsch.chem.Ges. 69, (1936): 1745-1754.
KUHN, R. und WEYGAND, F.	o- und p-Nitrophenylhydroxylamin Ber.dtsch.chem.Ges. 69, (1936): 1969-1974.
KUHN, R. und WEYGAND, F.	Die Amadori-Umlagerung Ber.dtsch.chem.Ges. 70, (1937): 769-772.
LUND,H. und BJERRUM,J.	Eine einfache Methode zur Darstellung wasser-freier Alkohole Ber.dtsch.chem.Ges. 64, (1931): 210-213.
MATSUSHIMA,Y. and IMANAGA, Y.	A new synthesis of 2-Deoxy-D-Ribose Nature, 171, (1953): 475
MATSUSHIMA,Y. and IMANAGA,Y.	Amino hexoses. III.New synthesis of 2-deoxy-D-ribose Bull.chem.Soc.Japan, 26, (1953): 506-507, zit. nach Chem.Abstr. 49, (1953): 11560.

MAYER, R. und JÄSCHKE, L. — Zur Umwandlung von Formaldehyd in Kohlenhydrate
Justus Liebigs Ann.Chem., 635, (1960): 145-153.

MERCK F. AG — Anfärbereagenzien für Dünnschicht- und Papierchromatographie, Seite 5.

MICHEEL, F. und HAGEMANN, G. — Darstellung aliphatischer AMADORI-Produkte
Chem.Ber., 92, (1959): 2836-2840.

SCHMIDT, O.T. und HEINTZ,K. — Die Synthese der Hamamelonsäure
Justus Liebigs Ann.Chem., 515, (1934): 77-96.

SUZUKI, T. and HOCHSTER, R.M. — Extracellular accumulation and isolation of D-Ribulose in cultures of Agrobact. tumefaciens
Biochem.biophys.Res.Comm. 19, (1965): 637-642.

WEYGAND, F. — Über N-Glycoside.II.Mitteilung. Amadoriumlagerungen
Ber.dtsch.chem.Ges.73, (1940): 1258-1278.

D A N K

Ich danke Herrn Professor Dr. Haas für die freundliche Überlassung des Themas der vorliegenden Dissertation und für die jederzeit gewährte Unterstützung bei der Bearbeitung der verschiedenen Sachfragen. Im besonderen danke ich Herrn Professor Dr. Haas dafür, daß er in hervorragenderweise dazu beigetragen hat, stets eine außerordentlich günstige Arbeitsatmosphäre zu schaffen.

L E B E N S L A U F

Am 19. Dezember 1946 wurde ich als erste Tochter des Alexander Mattil und seiner Ehefrau Hilde, geb. Martin in Pirmasens geboren.

Von 1952 bis 1957 besuchte ich die Volksschule in Höheinöd, von 1957 bis 1964 das Neusprachliche Gymnasium der Englischen Fräulein in Landau und von 1964 bis 1966 das Neusprachliche Gymnasium in Pirmasens, an dem ich im Oktober 1966 die Reifeprüfung ablegte.
Im Wintersemester 1966/67 begann ich an der Universität des Saarlandes mit dem Studium an der Naturwissenschaftlichen Fakultät. Im Sommersemester 1967 wechselte ich zur Medizinischen Fakultät über und bestand im Februar 1968 die Naturwissenschaftliche Vorprüfung, im Oktober 1969 die Ärztliche Vorprüfung und im Dezember 1972 die Ärztliche Prüfung. Seit dem 1. Februar 1973 bin ich als Medizinalassistentin tätig.